

**Recherches sur la phosphorylation
des fonctions OH par les acides
polyphosphoriques et sur l'hydrolyse
des groupements monoester
alcoylphosphorique**

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur ès sciences chimiques

par

Joseph RABINOWITZ

de

SAFED (Israël)

Ingénieur-chimiste diplômé de l'Ecole polytechnique de l'Université de Lausanne
Assistant au Laboratoire de chimie organique et pharmaceutique

Thèse N° 1256

GENÈVE

Editions Médecine et Hygiène
1957



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552305_0090

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Laboratoire de chimie organique et pharmaceutique

FACULTÉ DES SCIENCES

Professeur E. CHERBULIEZ

**Recherches sur la phosphorylation
des fonctions OH par les acides
polyphosphoriques et sur l'hydrolyse
des groupements monoester
alcoylphosphorique**

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur ès sciences chimiques

par

Joseph RABINOWITZ

de

SAFED (Israël)

Ingenieur-chimiste diplômé de l'Ecole polytechnique de l'Université de Lausanne
Assistant au Laboratoire de chimie organique et pharmaceutique

Thèse N° 1256



GENÈVE

Editions Médecine et Hygiène

1957

La faculté des sciences, sur le préavis de Monsieur le professeur E. Cherbuliez, autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 14 mai 1956.

Le doyen :
Edouard PARÉJAS

Thèse N° 1256

Je tiens à exprimer ici mes plus vifs remerciements et ma sincère reconnaissance à Monsieur le professeur Emile Cherbuliez pour ses précieux conseils et l'intérêt constant qu'il a porté à ce travail.

A MA CHÈRE FAMILLE.

PREPARATION D'ACIDES AMINOALCOYL-PHOSPHORIQUES ET DE LEURS DERIVES N-ACYLES

En vue d'une étude de l'influence d'une fonction amino, libre ou acylée, sur la stabilité de la liaison ester phosphorique à laquelle elle serait associée dans la même molécule, nous avons préparé un certain nombre d'acides aminoalcoyl-phosphoriques ainsi que leurs dérivés acétylés, benzoylés et p-toluènesulfonylés.

1° Acides aminoalcoyl-phosphoriques (tableau I). Nous avons utilisé la phosphorylation des alcools aminés par les acides polyphosphoriques en modifiant quelque peu le mode opératoire décrit par Cherbuliez & Weniger 1) et Cherbuliez & Bouvier 2).

Les acides polyphosphoriques, de degré de condensation $n = 2$ à $2,7$, ont été préparés par chauffe de 6 h, à 240° , d'acide phosphorique à 85 % dans une capsule de platine.

Aminoalcools: la colamine, l'amino-3-propanol-1 et l'amino-2-butanol-1 ont été obtenus dans le commerce. Pour obtenir l'amino-4-butanol-1, nous avons réduit le γ -amino-butyrate d'éthyle (obtenu par estérification d'acide γ -amino-butyrique du commerce) par le sodium et l'alcool selon Bouveault & Blanc avec un rendement de 35 %. En outre, la maison Bayer AG, à Leverkusen, Bayerwerk, a bien voulu mettre à notre disposition, à titre gracieux, une certaine quantité de cet aminoalcool; quant aux amino-5-pentanol-1 et amino-6-hexanol-1, nous en sommes redevables aux Vereinigte Glanzstoff-Fabriken AG, Werk Obernburg am Main. Nous saisissons cette occasion pour renouveler à ces deux Maisons l'expression de nos remerciements les meilleurs.

Phosphorylation: environ 10 g d' aminoalcool sont ajoutés à une quantité d'acide polyphosphorique ($n = 2$ à $2,7$) correspondant à un excès de 50 à 100 % de fonctions P-O-P disponibles pour la phosphorylation. Le mélange est agité avec une baguette de verre; dès que le dégagement considérable de chaleur initial s'arrête, on chauffe 2 à 3 h au bain d'huile de 110° . Après refroidissement, on reprend la masse visqueuse par 150 ml d'eau et neutralise d'abord au carbonate de baryum jusqu'à apparition d'un précipité qui ne disparaît plus, et ensuite avec une solution concentrée chaude de baryte, jusqu'au virage de la phénolphthaléine 3). On filtre et lave plusieurs fois le précipité de phos-

1) Helv. 29, 2006 (1946).

2) Helv. 36, 1200 (1953).

3) Les précipités de sels barytiques sont fortement adsorbants surtout s'ils se forment sur un support de carbonate de baryum; c'est là la raison de cette manière de procéder. - On peut améliorer parfois quelque peu les rendements en agitant le précipité final de phosphates barytiques en suspension dans de l'acide sulfurique très dilué pendant plusieurs heures, et en traitant la liqueur séparée du précipité, par de la baryte, etc. comme décrit plus loin.

Tableau I.

Acides monoamino-alcoyl-phosphoriques.

Acide préparé	Alcool	Ac. polyphosph.	Durée chauff.	Rdt	Mol.d'eau de crist.	P.M. calc. trouvé	P % calc. trouvé	F. °C
colaminyl- phosphorique	colamine 12,0 g	50 g n = 2,4	2 h	19,4 g (70%)	0	141		233—235
amino-3-propyl- 1-phosphorique	amino-3-propanol-1 10,0 g	50 g n = 2,7	3 h	8,2 g (40%)	0	173 172 c)		176—180
amino-2-butyl- 1-phosphorique	amino-2-butanol-1 10,0 g	50 g n = 2,7	3 h	9,5 g (anhydre) (50%)	0 ^{a)} 1	169 169,5 c) 187	18,33 18,08 16,44	235—237 235—237
amino-4-butyl- 1-phosphorique	amino-4-butanol-1 10,0 g	50 g n = 2,7	3 h	9,5 g (50%)	0	169 170,5 b) 168,5 c)	18,33 17,84 18,35	223—225
amino-5-pentyl- 1-phosphorique	amino-5-pentanol-1 10,0 g	30 g n = 2,0	3 h	6,5 g (33%)	1	201 203,7 b) 204,0 c)	15,41 15,19	238—240
amino-6-hexyl- 1-phosphorique	amino-6-hexanol-1 10,0 g	25 g n = 2,0	3 h	4,7 g (28%)	0	197 194 b) 198 c)	15,73 15,97 15,65	245—247

a) Obtenu par séjour prolongé de l'acide cristallisé avec 1 H₂O, dans le vide sur P₂O₅.

b) Déterminé par titrage de la première acidité.

c) Déterminé par titrage de la deuxième acidité.

phate et polyphosphates de baryum avec de l'eau (ce précipité est fortement adsorbant) pour arriver finalement à un filtrat de 700 ml environ. Ce dernier est concentré par distillation sous pression réduite jusqu'à un volume de 200 ml environ. On y précipite l'ion Ba^{++} par adjonction de SO_4H_2 dilué jusqu'au virage du rouge de méthyle (pH 4 env.), ce qui correspond à la précipitation intégrale des ions Ba^{++} et à la formation d'acide monoaminoalcoyl-phosphorique libre. La liqueur limpide obtenue par centrifugation est concentrée par distillation sous pression réduite jusqu'à un volume de 50 à 100 ml. On filtre au besoin et ajoute 4 - 5 vol. d'alcool. La solution se trouble et l'acide monoaminoalcoyl-phosphorique cristallise au bout de quelques heures. Le produit filtré est lavé avec un peu d'alcool et séché dans le vide sur P_2O_5 . Comme nous n'avons pas étudié systématiquement les conditions de phosphorylation dans chaque cas, les rendements indiqués dans le tableau I constituent un minimum.

Analyses: a) Détermination du p. mol. par titrage alcalimétrique: des deux fonctions acides du reste phosphorique, l'une est neutralisée par la fonction amino, l'autre est libre. L'acidité libre est déterminée par titrage avec NaOH 0,1-n. à la phénolphthaléine; l'addition ultérieure de formol neutralisé en excès (blocage de la fonction amino) suivie d'une nouvelle neutralisation à la phénolphthaléine, permet de doser la deuxième fonction acide. Dans le tableau I, les p. mol. déterminés par ces deux titrages sont indiqués dans l'ordre de leur énumération.

b) Phosphore: on minéralise l'ester par chauffage de 24 h avec SO_4H_2 conc. et un peu de NO_3H conc. On dose l'acide phosphorique en le précipitant soit comme phosphate ammoniac-magnésien, soit comme phosphomolybdate d'ammonium. Dans le premier cas, on dose le phosphore par titrage du Mg à la complexone III; dans le second, on dissout le précipité dans de la soude caustique en quantité connue et titre l'acidité globale des composants du complexe après avoir ajouté du formol neutre à la phénolphthaléine pour masquer l'alcalinité de l'ammoniaque.

c) Baryum: à la complexone III, en présence de phthaléino-complexone comme indicateur.

Nous avons isolé l'acide amino-3-propyl-1-phosphorique également sous forme de son sel de baryum qui cristallise avec 3 molécules d'eau: on concentre à environ 100 ml le premier filtrat. On refiltre au besoin et précipite le sel de baryum par adjonction de 4 à 5 vol. d'alcool. Ce sel peut être utilisé directement pour la préparation des dérivés benzoylé et tosylé (voir plus loin).

$C_3H_8O_4NPBa$, $3H_2O$	Calculé P 9,00	Ba 39,87 %	p.mol. 344,5
	Trouvé " 8,91; 9,07	" 40,20; 40,14 %	" 349

2° Acides acétaminoalcoyl-phosphoriques (tableau II). Les acides aminoalcoyl-phosphoriques décrits sous 1° ont été acétylés par l'anhydride acétique en milieu pyridique.

2 à 3 g d'acide monoaminoalcoyl-phosphorique, 20 ml de pyridine et 7 à 10 ml d'anhydride acétique sont agités 3 - 4 h dans un bain à 60°; au bout de ce laps de temps, tout a passé en solution. Après refroidissement, on élimine les composants volatils sous pression réduite, reprend le résidu par un peu d'eau et évapore à nouveau pour éliminer intégralement l'anhydride acétique. Le résidu visqueux est neutralisé par l'eau de baryte saturée jusqu'au virage de la phénolphthaléine, la solution est filtrée et évaporée sous pression réduite. On reprend dans 25 à 30 ml d'eau, filtre et ajoute au filtrat 3 à 4 vol. d'alcool; le sel de Ba du dérivé acétylé de l'acide aminoalcoyl-phosphorique cristallise alors sous forme de paillettes. On filtre, lave le sel par un mélange eau-alcool et sèche dans le vide.

Comme les sels de baryum permettaient facilement la préparation des solutions devant servir à l'étude cinétique de l'hydrolyse des acides en question, nous n'avons pas essayé d'isoler les acides libres. Leurs solutions aqueuses s'obtiennent par élimination de l'ion baryum par la quantité correspondante d'acide sulfurique.

A côté du dosage de P et de Ba, effectué comme nous l'avons décrit plus

Tableau II.
Acides acétylaminoalcoyl-phosphoriques (sels de Ba).

Dérivé acétylé	Aminoester utilisé	Rdt	Ba %		P %		P. M.	
			calc.	trouvé	calc.	trouvé	calc.	trouvé
Acétylcolaminyl- phosphate de Ba, 2H ₂ O	3,0 g	3,8 g (50%)	38,81	38,91 38,60	8,75	8,72 8,57	354,4	356
Acétylamino-3-propyl- 1-phosphate de Ba, 3H ₂ O	4,7 g	5,9 g (59%)	35,54	35,76 35,51	8,03	8,05 8,10	386,4	387
Acétylamino-2-butyl- 1-phosphate de Ba, 3H ₂ O	2,0 g	2,2 g (47%)	34,30	34,80	7,75	7,85	400,4	407
Acétylamino-4-butyl- 1-phosphate de Ba, 4H ₂ O	3,0 g	4,5 g (63%)	32,67	32,18 32,20	7,41	7,34	418,4	423

Tableau III.
Acides benzoylaminoalcoyl-phosphoriques (sels de Ba).

Dérivé benzoylé	Ester utilisé	C ₆ H ₅ -CO-Cl	Baryte	Rendement (prod. recrist.)	Ba %		P %		P.M. par dosage alcalimétrique	
					calc.	trouvé	calc.	trouvé	calc.	trouvé
benzoylcolaminyl- phosph. de Ba, 3H ₂ O	3,2 g	6,3 g	20 g	5,3 g (52%)	31,61	31,52	7,15	7,18	434,4	432
benzoylamino-3-propyl-1- phosph. de Ba, 2H ₂ O	6,0 g (sel de Ba)	6,3 g	14 g	5,0 g (72%)	31,98	31,90 32,00	7,20 7,24	7,19 7,24	430,4	430
benzoylamino-2-butyl-1- phosph. de Ba, 3H ₂ O	2,3 g	4,0 g	15 g	3,0 g (48%)	29,70	29,55	6,70	6,61	462,4	458
benzoylamino-4-butyl-1- phosph. de Ba, 3H ₂ O	2,0 g	4,0 g	15 g	3,0 g (55%)	29,70	29,86	6,70	6,57	462,4	462
benzoylamino-5-pentyl-1- phosph. de Ba	2,0 g	3,5 g	12 g	2,4 g (57%)	32,50	32,46	7,33	7,29	422,4	419

haut, nous avons déterminé ici encore le poids moléculaire de nos produits par un dosage alcalimétrique: une prise en solution aqueuse est acidulée avec de l'acide chlorhydrique décimormal jusqu'au-delà du virage du méthylorange; après avoir amené la liqueur au pH du virage du méthylorange, on neutralise à la phénolphtaléine, ce qui représente une consommation de un équivalent de base par molécule de dérivé phosphorylé. On ajoute ensuite du formol neutre à la phénolphtaléine pour vérifier l'absence de groupement amino libre; dans tous les cas, nous avons constaté l'absence d'un changement de pH, ce qui prouve que la fonction amino était complètement bloquée.

Les sels de baryum des dérivés acétylés sont moins solubles que les sels de baryum des acides non acétylés; leur solubilité est de l'ordre de 1 g dans 5 à 6 ml d'eau à la température ordinaire.

3° Acides benzoylaminoalcoyl-phosphoriques (tableau III).

Par traitement des acides aminoalcoyl-phosphoriques par le chlorure de benzoyle en milieu barytique, on obtient une cristallisation directe du sel de baryum du dérivé benzoylaminoalcoyl-phosphorique. Ces sels de baryum, nettement moins solubles que ceux des dérivés acétylés (solubilités de l'ordre de 1 g. de sel de baryum dans 100 à 150 ml d'eau) ont été analysés comme les dérivés acétylés correspondants. Le titrage au formol a montré dans chaque cas l'absence de fonctions amino libres.

2 à 3 g d'acide aminoalcoyl-phosphorique (ou bien la quantité correspondante de sel de baryum), 4 à 6 g de chlorure de benzoyle, 15 à 20 g de Ba(OH)_2 aq. pulvérisés et 100 ml d'eau sont agités à la température ordinaire 2 à 3 h. Le précipité formé est filtré et lavé avec un peu d'eau. On le recristallise en le traitant par 500 à 700 ml d'eau bouillante; on filtre et laisse le filtrat se refroidir en y ajoutant 1/2 vol. d'alcool. Les cristaux (généralement des pailettes) sont filtrés, lavés par un mélange eau-alcool et séchés dans le vide.

Comme dans le cas des dérivés acétylés, nous n'avons pas cherché à isoler les acides libres; l'acide benzoylaminoalcoyl-phosphorique, déjà assez peu soluble dans l'eau (0,7 % à la température ordinaire, 3 % env. à 100°) précipite lorsqu'on traite son sel de baryum par de l'acide chlorhydrique 2-n. Lavé avec un peu d'eau et séché dans le vide sur chlorure de calcium, cet acide retient une molécule d'eau de cristallisation et fond dans cet état à 147°. Le produit est exempt de fonctions amino libres (titrage au formol négatif).

$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{NP}, \text{H}_2\text{O}$ Calculé P 10,16 % p.mol. 305 Trouvé P 10,20 % p.mol. 307

4° Acides tosylaminoalcoyl-phosphoriques (tableau IV). Les sels de baryum de ces acides étant encore beaucoup moins solubles (solubilités de l'ordre de 1 g dans 300 à 400 ml d'eau à la température ordinaire), on les obtient très facilement par traitement des acides par le p-toluènesulfochlorure en milieu barytique (baryte ou NaOH + chlorure de baryum). Les analyses ont été effectuées comme décrit précédemment.

1,5 à 2 g d'acide aminoalcoyl-phosphorique, 2,4 à 3 g de p-toluènesulfochlorure, 9 à 11 g d'hydroxyde de baryum (ou bien 4 à 6 g de chlorure de baryum + 30 à 40 ml NaOH 2-n.) et 50 ml d'eau sont agités 2 h sur un bain-marie bouillant. Après refroidissement, on filtre le précipité (qui s'est déjà formé à chaud), et on le lave avec du benzène puis avec de l'éther pour le débarrasser du chlorure de tosyloxy qui n'a pas réagi. On termine par un lavage à l'eau, puis sèche dans le vide. Le produit brut (3 g environ) est repris par 500 ml d'eau bouillante, et filtré. Le filtrat est additionné d'un demi-volume d'alcool: le sel barytique du dérivé tosylé cristallise en pailettes. En répétant l'opération plusieurs fois en utilisant chaque fois la solution saturée de l'opération précédente, on obtient finalement le dérivé tosylé pur avec un rendement qui n'a jamais dépassé la moitié du poids du produit brut.

Les vérifications analytiques ont été effectuées comme décrit plus haut.

Tableau IV.
Acides tosylaminoalcoyl-phosphoriques (sels de Ba, tous avec 3H₂O).

Dérivé tosylé	Amino- ester utilisé	C ₆ H ₅ SO ₃ Cl	Autres composants	Rendement	Ba %		P %		P. M. par dosage alcalimétrique	
					calc.	trouvé	calc.	trouvé	calc.	trouvé
tosylcolaminyl-phosph. de Ba	1,4 g	2,2 g	2,5 g BaCl ₂ 5 ml H ₂ O 20 ml NaOH 2-n.	brut: 3,6 g (70%) recrist.: 1,8 g (35%)	28,35	28,13 28,19	6,38	6,25 6,22	484,4	480
tosylamino-3-propyl-1- phosph. de Ba	2,9 g (sel de Ba)	2,2 g	1,2 g BaCl ₂ 10 ml H ₂ O 15 ml NaOH 2-n.	brut: 3,6 g (81%) recrist.: 1,8 g (40%)	27,49	27,12 27,15	6,20	6,17 6,17	498,4	492
tosylamino-2-butyl-1- phosph. de Ba	2,0 g	3,0 g	50 ml H ₂ O 15 g baryte	brut: 3,2 g (59%) recrist.: 1,5 g (28%)	26,81	26,20	6,05	5,86	512,4	508
tosylamino-4-butyl-1- phosph. de Ba	1,7 g	3,0 g	50 ml H ₂ O 20 g baryte	brut: 3,2 g (70%) recrist.: 1,4 g (31%)	26,81	26,19 26,53	6,05	5,85	512,4	516

SUR LA PHOSPHORYLATION DES HYDROXY-ACIDES PAR LES ACIDES POLYPHOSPHORIQUES

A côté des acides aminoalcoyl-phosphoriques que nous avons obtenus avec des rendements acceptables par phosphorylation des aminoalcools à l'aide d'acides polyphosphoriques, nous avons voulu préparer des acides carboxyalcoyl-phosphoriques par la même méthode, à partir d'hydroxyacides. Toutefois, ici les rendements sont très faibles, voire nuls 1).

Voici quelques rendements en acides carboxyalcoyl- ou carboxyaryl-phosphoriques, obtenus par nous lors du traitement des hydroxyacides correspondants, par de l'acide polyphosphorique en excès pendant 8 h à 110° et isolement des dérivés phosphorylés sous forme de sels de baryum 2) (traitement au cours duquel les alcools et les aminoalcools sont phosphorylés avec des rendements pouvant atteindre 50 %): acide glycolique 0 %, acide lactique 8 % 3), acide β -hydroxypropionique 0,6 % (très forte déshydratation en acide acrylique), acide α -amino- β -hydroxypropionique (sérine) 0 %, acide salicylique 3 %.

Cette constatation pose deux problèmes que nous allons traiter successivement: celui des moyens permettant éventuellement de tourner ces difficultés et celui du mécanisme expliquant l'effet inhibiteur exercé par des fonctions carboxyle sur la réaction entre groupements hydroxyle et acide polyphosphorique.

I. Phosphorylation des hydroxyacides par les acides polyphosphoriques.

En supprimant la fonction carboxyle libre, on fait disparaître l'obstacle à la phosphorylation par les acides polyphosphoriques. Pour obtenir les acides carboxyalcoyl- ou carboxyaryl-phosphoriques à l'aide des acides polyphosphoriques, il suffit dès lors de remplacer la fonction carboxyle libre (ionisable) par un groupement non ionisé qui, après phosphorylation, se laisse transformer en groupe COOH. Nous avons eu recours avec le même succès aux esters, aux amides et aux nitriles des hydroxyacides. Pour obtenir

1) D'ailleurs, la phosphorylation des hydroxyacides par POCl_3 donne également de très mauvais rendements: acide lactique 6 %, Th. Wagner-Jauregg, Ber. deutsch. chem. Ges. 68, 670 (1935); acide β -chlorolactone 14,3 % (déterminé sur le produit d'élimination de ClH), E. Baer & H.O.L. Fischer, J. biol. Chemistry 180, 145 (1949); acide pyruvique 10 %, W. Kissling, Ber. deutsch. chem. Ges. 68, 597 (1935).

2) VIII; Helv. 39, 1455 (1956).

3) E. Cherbuliez & H. Weniger, Helv. 29, 2006 (1946).

les acides carboxyalcoyl- (ou carboxyaryl-) phosphoriques, on peut, soit effectuer une saponification sélective de ces fonctions auxiliaires (ce qui est souvent facile à réaliser grâce à la très grande variation de l'hydrolysabilité des groupements ester phosphorique en fonction du pH), soit - dans le cas des amides - faire agir de l'acide nitreux sur ces derniers.

Il est intéressant de noter que par ce procédé, on peut obtenir aisément des dérivés phosphorylés de la forme énolique d'acides cétocarboxyliques, par exemple l'acide phosphoénolpyruvique 4) 5).

1° Acides carbalcoyalcoyl (ou aryl)-, carbamidoalcoyl (ou aryl)- et cyanalcoyl (ou aryl)-phosphoriques (tableau I). Toutes les phosphorylations ont été effectuées selon la procédure générale suivante: on traite les dérivés à phosphoryler par de l'acide polyphosphorique en excès pendant quelques heures à une température de 80 à 110° (selon la stabilité du produit de départ). Après refroidissement, on reprend à l'eau, extrait éventuellement à l'éther le produit de départ non transformé, neutralise au carbonate de baryum et à la baryte comme décrit dans le précédent chapitre, concentre dans le vide à petit volume la solution séparée du précipité bien lavé à l'eau, et ajoute 3 à 4 vol. d'alcool. Les produits obtenus se sont montrés purs à l'analyse, quoique quelquefois colorés en jaune. On les obtient alors incolores en les dissolvant dans de l'eau en présence de noir animal et en précipitant le filtrat par addition de 4 volumes d'alcool.

Les dosages et les déterminations des p. mol. ont été effectués selon les procédés indiqués précédemment.

Nous n'avons pas étudié systématiquement les conditions fournissant un rendement maximum; les rendements indiqués représentent donc une limite inférieure, ceci d'autant plus qu'ils se rapportent au produit retiré directement du filtrat après précipitation du phosphore minéral par la baryte. En effet, il y a parfois une adsorption assez considérable des sels barytiques des dérivés phosphorylés, qu'on peut récupérer, du moins en partie, par traitement du précipité de sels barytiques, avec de l'acide sulfurique très dilué, etc. (voir note 4) du chapitre précédent.

Dans la phosphorylation des hydroxynitriles, il faut éviter des températures supérieures à celles indiquées, ceci surtout pour les nitriles aliphatiques qui, autrement, sont polymérisés très largement.

2° Acides carboxyalcoyl (carboxyaryl)-phosphoriques. a) Par hydrolyse sélective de fonctions carbalcoxy, carbamido ou nitrile (tableau II), réalisée par ébullition de solutions généralement 0,1-m. en dérivé phosphorylé, en milieu acide ou en milieu alcalin.

Si l'opération se fait en milieu acide, on utilise l'acide sulfurique qu'on élimine ensuite par neutralisation à la baryte au pH 8,5 (virage de la phénolphthaléine). La liqueur débarrassée du précipité est concentrée sous vide, la séparation du sel de Ba (qui commence généralement déjà pendant la concentration) est achevée par addition d'alcool. L'hydrolyse acide peut aussi être effectuée directement sur le produit brut de phosphorylation; il suffit de porter à l'ébullition à reflux la solution de ce dernier dans une quantité d'eau telle que le milieu soit à peu près m. en acide phosphorique.

Si l'on procède en milieu alcalin, il y a en général avantage à élimi-

4) La phosphorylation de l'acide pyruvique par action directe d'acides polyphosphoriques a été décrite sous toute réserve; ce résultat n'a pas été reproductible. E. Cherbuliez & H. Weniger, Helv. 29, 2006 (1946).

5) Ce procédé de phosphorylation d'hydroxyacides a fait l'objet de la demande de brevet suisse n° 33058.

Tableau I.

Hydroxy-ester, amide ou nitrile	Ac.-poly- phosph.	Durée et temp. de réaction	Produit obtenu (poids, rendement)	Ba % calc. trouvé	P % calc. trouvé	N % calc. trouvé	P. mol. calc. trouvé	
glycolate d'éthyle 7 g	40 g (n = 2,7)	5 h 100°	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OPO}_3\text{Ba}, \text{H}_2\text{O} \\ \\ \text{COOC}_2\text{H}_5 \end{array}$	4,5 g 20%	40,7 40,4	9,19 9,14	337,4 341	
lactate d'éthyle 9 g	40 g (n = 2,7)	5 h 100°	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CHOPO}_3\text{Ba}, 2 \text{H}_2\text{O} \\ \\ \text{COOC}_2\text{H}_5 \end{array}$	7,7 g 27%	37,2 36,9	8,39 8,42	369,4 365	
sérinate de méthyle 2 g	10 g (n = 2)	5 h 100°	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OPO}_3\text{HBa}_{0,5} \\ \\ \text{CHNH}_2 \\ \\ \text{COOCH}_3 \end{array}$	0,7 g 15%	25,7 25,2	11,6 12,0	266,6 264	
salicylate de méthyle 5 g	18 g (n = 2)	5 h 115°		5,0 g 40%	35,7 35,2	8,05 7,96	385 388	
pyruvate de méthyle 10 g	25 g (n = 3)	8 h 90°	$\begin{array}{c} \text{CH}_3^*) \\ \\ \text{COPO}_3\text{Ba}, \text{H}_2\text{O} \\ \\ \text{COOCH}_3 \end{array}$	15,5 g 47%	40,9 40,9	9,25 9,32	335,4 333	
glycolamide 3,5 g	15 g (n = 3)	6 h 100°	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OPO}_3\text{Ba}, \text{H}_2\text{O} \\ \\ \text{CONH}_2 \end{array}$	3,5 g 25%	44,5 43,9	10,06 9,90	308,4 309	
salicylamide 10 g (7,1 g récupérés)	25 g (n = 2)	6 h 105°		2 g 27% **)	37,1 36,8	8,38 8,21	370,4 372	
glyconitrile 3 g	20 g (n = 2)	20 h 55°	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OPO}_3\text{Ba}, 3 \text{H}_2\text{O} \\ \\ \text{CN} \end{array}$	3 g 18%	42,0 42,2	9,50 9,41	4,29 4,30	326,4 325
β -hydroxy- propionitrile 10 g	40 g (n = 2,7)	4 h 100°	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OPO}_3\text{Ba}, 3 \text{H}_2\text{O} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CN} \end{array}$	12 g 25%	40,3 40,0	9,11 9,08	4,11 4,12	340,4 341
salicylonitrile 5,2 g (3,0 g récupérés)	15 g (n = 3)	7 h 100°		1,5 g 20% **)	33,8 33,6	7,63 7,64	3,59 3,47***)	406,4 408

*) Ce sel est complètement déphosphorylé à 100° en milieu ClH n. en 1 h (temps de demi-hydrolyse de l'ordre de 10 min, très voisin de celui de l'acide phospho-énolpyruvique); dans la liqueur d'hydrolyse, la dinitrophényl-hydrazine provoque immédiatement la précipitation de la pyruvo-dinitrophényl-hydrazone F. 213° (F. du mélange avec une hydrazone authentique sans dépression).

**) Rendement rapporté à la quantité de produit de départ non récupéré.

***) N déterminé par titrage au formol du NH_3 formé après hydrolyse alcaline (NaOH n.) en ampoule scellée.

ner d'abord le Ba^{++} (qui active parfois l'hydrolyse alcaline des fonctions ester phosphorique) 6) par SO_4H_2 ; on amène ensuite la liqueur à l'alcalinité voulue par addition de $NaOH$. Après hydrolyse, on ajoute du chlorure de baryum en quantité stoechiométrique (1,5 mol. par mol. d'acide phosphorylé) et précipite si nécessaire, par addition d'alcool.

Dans les deux cas, les sels de Ba sont généralement d'emblée purs; au besoin, on les reprend dans de l'eau à la température ordinaire, filtre et re-précipite par addition de 3 à 4 volumes d'alcool.

b) Par action de NO_2H sur une fonction amide. Cette opération n'a été appliquée qu'au dérivé phosphorylé du salicylamide. 0,5 g d'o-carbamidophényl-phosphate de baryum sont dissous dans 8 cm³ d'acide sulfurique n. Sans éliminer le sulfate de baryum, on introduit dans la solution maintenue entre 0 et 5° successivement 3 fois 0,5 g de nitrite de baryum. Après repos au froid durant la nuit, on neutralise par la baryte à la phénolphthaléine, filtre et précipite le salicylrophosphate sesquibarytique par addition de 4 volumes d'alcool. Rendement 0,42 g (68 %).

$C_7H_4O_6PBa_{1,5}$, 2H₂O (457) Calculé P 6,79 Ba 45,1 % Trouvé P 6,79 Ba 44,3 %

Tableau II.

Produit de départ: sel de Ba de	Milieu d'hydrolyse, durée	Produit obtenu	Rdt %	Ba % calc. trouvé	P % calc. trouvé
$CH_3OPO_3H_2$ $COOC_2H_5$	$NaOH$ n. 1 h 30	CH_3OPO_3Ba $COOBa_{0,5}$	95%	57,4 56,8	8,64 8,54
$CH_3OPO_3H_2$ $CONH_2$	$Ba(OH)_2$ n. 1 h 30	id.	20% *)	57,4 57,0	8,64 8,55
$CH_3OPO_3H_2$ CN	SO_4H_2 n. 1 h	id. **)	50%	57,4 58,9	8,64 8,61
id.	$NaOH$ n. 1 h 30	id.	80%	57,4 57,0	8,64 8,61
OPO_3H_2 $CH_3-CH-COOC_2H_5$	$NaOH$ n. 1 h 30	OPO_3Ba , 2 H ₂ O $CH_3-CH-COOBa_{0,5}$	90 %	50,4 50,0	7,58 7,50
OPO_3H_2 CH_2-CH_2-CN	SO_4H_2 n. 1 h 30	OPO_3Ba $CH_2-CH_2-COOBa_{0,5}$	70 %	55,2 55,0	8,31 8,36
OPO_3H_2 $CH_2-C-COOCH_3$	$NaOH$ n. 1 h 30	$OPO_3Ba^{***})$ $CH_2-C-COOBa_{0,5}$, 3 aq.	56 %	48,5 48,0	7,29 7,29

*) Voir note * 6

**) Avant la neutralisation à la baryte, diluer la solution du produit de phosphorylation à 100 ml/g de sel mis en œuvre, le sel de Ba formé étant assez peu soluble.

***) Identifié également par le temps de $\frac{1}{2}$ hydrolyse en milieu chlorhydrique n. à 100° (10 min) et par l'obtention, à partir du produit d'hydrolyse, de la pyruvo-dinitrophénylhydrazone.

6) L'effet catalyseur de l'hydrolyse alcaline d'une fonction ester phosphorique exercé par l'ion Ba^{++} ressort notamment du résultat de l'hydrolyse barytique du phosphoglycolamide, dont le rendement en dérivé phosphorylé n'est que de 20 %, comparé à l'hydrolyse par $NaOH$ n. du nitrile correspondant (hydrolyse qui passe par le stade d'amide) et dont le rendement est de 80 % (tableau II).

II. Sur le mécanisme de l'inhibition de la phosphorylation des hydroxyacides par l'acide polyphosphorique.

Lorsqu'on compare les rendements obtenus dans la phosphorylation, par les acides polyphosphoriques, respectivement des alcools et des aminoalcools, on constate que les rendements sont généralement un peu plus élevés avec ces derniers. On pourrait donc penser à un effet électrostatique, jouant en faveur du rapprochement entre molécule d' aminoalcool et celle de l'agent phosphorylant, et jouant en défaveur de ce même rapprochement dans le cas d'un hydroxyacide avec sa fonction carboxyle ionisée en tous cas au moins partiellement. Mais deux observations contredisent cette conception: 1° même lorsque la fonction carboxyle et la fonction hydroxyle sont portées par deux molécules différentes, il y a inhibition de la phosphorylation; 2° la fonction sulfonique n'entrave pas la phosphorylation.

Ad 1°: Un mélange équimoléculaire d'acide acétique et de méthanol, chauffé avec de l'acide polyphosphorique en excès pendant 6 h à 100°, n'a fourni que 3 % d'acide méthylphosphorique; par contre, la presque totalité de l'acide acétique a été transformée en acétate de méthyle.

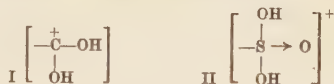
Ad 2°: Un mélange équimoléculaire d'acide méthanesulfonique et de méthanol, traité par de l'acide polyphosphorique dans les mêmes conditions, a fourni 37 % d'acide méthylphosphorique (rendement normal), et il n'y a eu aucune estérification entre méthanol et acide sulfonique.

D'autre part, l'acide iséthionique, $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$, traité de la même manière avec de l'acide polyphosphorique, a fourni avec un rendement de 50 % l'acide (sulfonique-2-éthyl-1)-phosphorique, isolé sous forme de son sel sesquibarytique selon le procédé général décrit sous I, 1.

$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_7\text{SPBa}_{1,5}$	$2\text{H}_2\text{O}$	Calculé P 6,97	Ba 46,3 %	p. mol. 445
		Trouvé " 6,93	" 46,5 %	" 438

La différence entre fonctions sulfonique et carboxyle, déterminante ici, nous semble devoir être cherchée dans le caractère respectivement saturé et à octet complet du S, et non saturé coordinativement et à lacune électronique du C, de ces deux fonctions. Grâce à ce caractère, le carboxyle peut, avec un proton, donner lieu dans le milieu non aqueux à un ion carbenium I dont le carbone, avec sa place de coordination vacante et sa lacune électronique, peut additionner un anion ce qui conduira à la formation facile, dans le milieu déshydratant, d'une fonction anhydride (avec l'acide acétique soit l'anhydride acétique, soit l'acide

acétylphosphorique), anhydride qui réagira avec l'alcool pour donner un ester carboxylique, qu'il s'agisse de l'anhydride carboxylique ou de l'anhydride mixte. L'acide sulfonique par contre ne pourra donner naissance par addition d'un proton qu'à un ion complexe du type II qui ne constitue aucunement un terme intermédiaire favorisant la formation d'un groupement anhydride.



L'acide phosphorique lui-même, à P saturé coordinativement et à octet complet, ne gêne effectivement pas la phosphorylation, il la ralentit seulement par un effet de dilution. L'acide borique par contre, à B à lacune électronique et non saturé coordonativement comme le C de la fonction carboxyle, inhibe à son tour la phosphorylation: un mélange équimoléculaire de B(OH)_3 et de CH_3OH , traité de la manière décrite plus haut avec de l'acide polyphosphorique, ne fournit que 7 % d'acide méthylphosphorique. (La formation facile de groupements borophosphoriques et leur alcoolyse en ester borique et acide phosphorique libre a déjà été constatée par Cherbuliez et coll.) 7).

La formation du groupement anhydride d'acide au cours de la réaction d'un acide carboxylique avec de l'acide polyphosphorique nous semble être rendue probable, tout particulièrement par les essais suivants.

Un mélange équimoléculaire d'acide acétique (resp. d'acide benzoïque) et de phénol est chauffé avec un excès d'acide polyphosphorique 18 h à 60° (à température plus élevée, il y a résinification très marquée du phénol). Le produit de réaction repris par de l'eau, extrait par l'éther et soumis au traitement général décrit plus haut, a fourni seulement 3 % (5 %) d'acide phénylphosphorique; l'extrait étheré, débarrassé de l'acide acétique et du phénol par lavage avec de la soude caustique diluée et séché, a fourni par distillation de l'acétate de phényle avec un rendement de 60 % (resp. du benzoate de phényle, rdt. 68 %). - L'estérification directe du phénol est une réaction très lente.

Dans le traitement d'un hydroxyacide donnant facilement naissance à des dérivés résultant d'une estérification intermoléculaire, par exemple l'acide glycolique, on constate effectivement la formation de ces esters intermoléculaires sous l'influence de l'acide polyphosphorique.

Des quantités équimoléculaires d'acide glycolique et d'acide pyrophosphorique sont chauffées 5 h à 110° . Les titrages de l'acidité à la phénolphtaléine d'une prise montrent une diminution de cette acidité. La formation d'acide phosphoglycolique ne modifie pas l'acidité titrable à cet indicateur. Cette diminution ne peut donc résulter que de la formation d'acides polyglycoliques. La présence de ces derniers est confirmée par une saponification par ébullition de 15 min. d'une prise, neutralisée d'abord à la phénolphtaléine, avec un excès connu de NaOH 0,5-n. et titrage en recul à la phénolphtaléine. Dans ces conditions, l'acide phosphoglycolique n'est absolument pas attaqué.

7) E. Cherbuliez, J.P. Leber & A.M. Ulrich, Helv. 36, 910 (1953).

La diminution d'acidité au premier titrage montre une disparition de 90 % des fonctions carboxyle glycoliques, qui sont retrouvées par hydrolyse (deuxième titrage). Le phosphore non précipité par Ba^{++} en milieu neutre à la phénol-phtaléine, déterminé après désagrégation acide, montre qu'il ne s'est formé que 0,4 % d'acide phosphoglycolique.

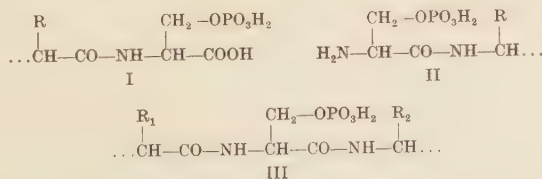
On comprend ainsi que l'acide polyphosphorique exerce tantôt une action phosphorylante et tantôt une action favorisant l'estérification. Cette dernière est déjà connue; Erlanger & Hall (8) par exemple décrivent la préparation d'esters benzyliques d'acides aminés à l'aide d'acides polyphosphoriques "comme agents déshydratants".

FACTEURS STRUCTURAUX DE LABILISATION ALCALINE DE FONCTIONS MONOALCOYL(MONOARYL)-PHOSPHORIQUES

I. Généralités.

D'une manière générale les monoesters de l'acide phosphorique opposent à l'hydrolyse en milieu alcalin une résistance frappante. Font exception notamment les groupements ester phosphorique de la caséine et des peptides résultant d'une dégradation hydrolytique partielle des protéines caséiniques, ainsi que les acides α -cétoalcoyl-phosphoriques (p. ex. acide glucose-phosphorique-2 ou ester de Hatano). Il existe donc des facteurs de structure des molécules qui provoquent une labilisation, en milieu alcalin, de la fonction ester phosphorique. Nous nous sommes proposé de rechercher quels pouvaient être ces facteurs, et ceci surtout dans l'espoir d'élucider les causes de l'alcalino-labilité du phosphore de certains protides. Dans cette étude, nous ferons abstraction des hydrolyses catalysées soit par des enzymes, soit par des catalyseurs minéraux tels que les hydroxydes de certains métaux polyvalents 1).

Dans la caséine et dans les polypeptides issus des protéines caséiniques par hydrolyse partielle, le phosphore est présent sous forme de fonction monoester phosphorique, avant tout sur des restes de sérine engagés dans une chaîne polypeptidique, le reste de sérine pouvant être terminal (I ou II) ou inséré dans la chaîne (III).



1) D'après les travaux d'E. Bamann, cette catalyse rappelle considérablement l'action des phosphatases; voir p. ex. E. Bamann, H. Trapmann & A. Schwegraf, Chem. Ber. 88, 1726 (1955).

Nous avons dès lors examiné si la présence d'une unique fonction amino, acylée ou non, ou d'une unique fonction carboxyle, libre ou transformée en amide, dans le voisinage d'un groupement monoester phosphorique avait un effet marqué sur l'hydrolysabilité de ce dernier, et ceci à plusieurs pH. En effet, la relation entre vitesse d'hydrolyse des monoesters phosphoriques et le pH est particulièrement compliquée. Cette vitesse est généralement assez grande en milieu très acide, passe par un minimum à un pH de l'ordre de 0 pour atteindre un maximum à pH 4,5; ensuite elle diminue de nouveau avec l'augmentation du pH (un deuxième minimum du côté alcalin n'a guère été observé jusqu'à présent; nous en avons trouvé par contre au moins deux exemples dans les dérivés étudiés dans ce mémoire; nous reviendrons ultérieurement sur ce point). Cette relation si compliquée entre vitesse d'hydrolyse et pH nous semble devoir être rattachée à l'existence de plusieurs types de réactions de scission à effet hydrolytique: acidolyse, hydrolyse proprement dite, basolyse et halolyse, types qui ont été mis en évidence antérieurement 2). Dans ces conditions, il est à prévoir que l'effet inhibiteur ou accélérateur de facteurs structuraux sur l'hydrolyse de groupements esters phosphoriques peut varier en fonction du pH; voici pourquoi nous avons en principe étudié les vitesses d'hydrolyse de nos dérivés à trois pH: en milieu acide (ClH n.), au pH 4,5 (pH de neutralisation de la première fonction acide d'un reste phosphorique monoestérifié et en même temps pH où la courbe des vitesses d'hydrolyse en fonction du pH passe généralement par un maximum) et en milieu alcalin (NaOH n.).

Les vitesses d'hydrolyse ont été déterminées à 100°, en solution décimolaire en ester phosphorique, sans addition de tampon. En effet, les ions apportés par les substances tampon peuvent avoir une action assez marquée sur la vitesse d'hydrolyse 3). Dans les limites de précision de nos mesures, nous pouvions d'ailleurs renoncer à l'emploi de substances tampons, comme le montrent les considérations suivantes. Le pH 4,5 correspond à la neutralisation d'un premier équivalent acide du reste phosphorique présent. A ce pH, la mise en liberté d'une troisième fonction acide de la molécule PO_4H_3 n'a pratiquement aucun effet sur la concentration en ions H^+ , la constante de dissociation K_3 de l'acide orthophosphorique étant de $4,8 \times 10^{-13}$. Des mesures du pH avant et après hydrolyse ont confirmé cette prévision. A fortiori, il en sera de même en milieu chlorhydrique n. Quant au pH en milieu NaOH n., la concentration molaire de la soude caustique était 10 fois plus élevée que celle de l'ester phosphorique. Même si après hydrolyse intégrale la totalité des fonctions acides libérées était neutralisée - ce qui n'est pas le cas vu la très faible acidité de la troisième fonction acide de PO_4H_3 - cela n'aurait fait disparaître au maximum que 1/10 des ions OH présents au début, ce qui correspond à une diminution théorique maximum du pH de 0,05 unités. D'ailleurs, dans le cas des dérivés phosphorylés ne comportant aucun autre groupement hydrolysable, la marche de l'hydrolyse a effectivement présenté toujours l'allure d'une réaction du premier ordre si l'on fait abstraction d'une légère inhibition de l'hydrolyse à partir d'environ 80 % de scission, due à l'apparition en concentration croissante d'ions orthophosphoriques.

A titre d'exemple, nous donnerons dans la fig. 1 la représentation graphique de la marche de l'hydrolyse de l'acide amino-éthyl-phosphorique 0,1-n. au pH 4,5, selon l'équation $\log [a/(a-x)] = k \cdot t$. La droite représente la courbe théorique. On constate d'un côté que, aux très faibles pourcentages d'hydro-

2) E. Cherbuliez & J.-P. Leber, *Helv.* 35, 2589 (1952).

3) Dans le cas des esters phosphoriques, v. p. ex. E. Cherbuliez & Cl. Gandillon, *Arch. Sci.* 2, 103 (1956).

lyse, il y a de légers écarts dus à l'imprécision des déterminations de l'acide phosphorique mis en liberté en très petite quantité; mais on constate aussi,

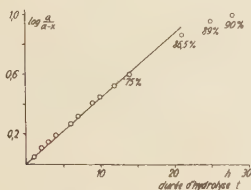


Fig. 1

Hydrolyse de l'acide amino-2-éthyl-phosphorique
droite correspondant à $t_{1/2} = 6,9$ h.

Chiffres en % : Degrés respectifs d'hydrolyse atteints aux temps t.

aux degrés d'hydrolyse élevés, un écart systématique vers des valeurs trop faibles, écart qui va en croissant. Cet écart est effectivement dû à l'intervention d'ions orthophosphoriques comme le montre le tableau 1 dans lequel sont consignés les degrés d'hydrolyse observés, toujours au pH 4,5, avec de l'acide amino-éthyl-phosphorique 0,1-m. additionné ou non de colamine, de colamine + acide orthophosphorique, et finalement de phosphate primaire de sodium, toujours à la concentration de 0,1-m. La colamine est sans effet mais l'addition d'ions phosphoriques provoque une diminution perceptible de la vitesse d'hydrolyse.

Tableau 1.
Hydrolyse de $H_2N-CH_2-CH_2-OPO_3H_2$ 0,1-m. au pH 4,5,
avec et sans produits ajoutés, en 7 h à 100°.

Produit ajouté	—	Colamine 0,1-m.	Colamine 0,1-m. + PO_4H_3Na 0,1-m.	PO_4H_3Na 0,1-m.
% hydrolyse . . .	51	50	48	48

Mode opératoire.

a) Préparation des solutions: Dans le cas des acides aminocalcoyl-phosphoriques libres, on a dissous dans un ballon jaugé de 25 ml 0,0025 moles de l'acide, respectivement dans ClH n., H_2O (puisque une fonction acide est bloquée par le groupe $-NH_2$) et NaOH n. Cette quantité de solution permet de remplir, à l'aide d'une pipette, 12 ampoules en verre neutre (Iéna) de 2 ml de capacité, qu'on scelle ensuite.

A partir des sels de baryum des dérivés phosphorylés à fonction NH_2 acylée, nous avons procédé comme suit: solution dans ClH n.: 0,002 moles de sel sont dissous dans 10 ml ClH 2-n., additionnés d'une quantité équivalente de SO_4H_2 2-n. (élimination de l'ion baryum), centrifugés pour la séparation du sulfate de baryum et ramenés au volume de 20 ml avec l'eau de lavage du culot de sulfate de baryum. Solutions de pH 4,5 : 0,002 moles de sel sont suspendus dans quelques ml d'eau, on ajoute de nouveau la quantité calculée de SO_4H_2 2-n., centrifuge pour séparer du sulfate de baryum, ajoute la quantité de NaOH n. nécessaire pour neutraliser la première fonction acide de ces esters et porte le volume de la solution à 20 ml par addition d'eau. Solutions dans NaOH n. : on prépare une solution de 0,002 moles de l'acide libre comme on vient de le décrire, puis ajoute 10 ml NaOH 2-n. et amène le volume à 20 ml avec de l'eau. La mise en ampoules de ces solutions s'est faite comme décrit plus haut.

b) Mesures cinétiques. Les ampoules étaient chauffées dans un bain d'huile thermostatisé à $100^{\circ} \pm 0,1^{\circ}$. La détermination de l'acide phosphorique libéré était faite dans des ampoules prélevées à des intervalles de temps appropriés, par l'une des méthodes suivantes.

1° Titrage direct de l'acide phosphorique selon Brunisholz 4): on neutralise la solution à l'orangé de méthyle (neutralisation de la première fonction acide, soit de l'acide orthophosphorique libre, soit du reste ester orthophosphorique); on ajoute un excès de nitrate d'argent et on neutralise au rouge de chlorophénol ($\text{pH} = 7$) l'acidité qui correspond à la deuxième fonction acide des groupes phosphoriques estérifiés, ainsi qu'à l'acidité résultant de la transformation de l'acide orthophosphorique en phosphate triargentique insoluble. Comme on connaît la quantité de groupements phosphoriques présents dans la prise, on peut calculer la part afférente à l'acide orthophosphorique libéré dans ce titrage. Comme ici la première neutralisation au $\text{pH} 4,6$ se fait à un pH différent de celui de la deuxième neutralisation ($\text{pH} 7$), et que l'on travaille en présence d'acides alcoylphosphoriques dont les sels restent en solution, il faut tenir compte du fait qu'à ce deuxième pH , la totalité de la deuxième fonction acide des restes monoesters phosphoriques n'est pas complètement neutralisée (effet tampon). Il faut donc établir des courbes d'étalonnage en titrant de la manière décrite des mélanges en proportions connues d'acide alcoylphosphorique et d'acide orthophosphorique 5).

2° Titrage de l'acide orthophosphorique libéré, isolé sous forme de phosphomolybdate d'ammonium. Cette séparation a été réalisée dans la plupart des cas par précipitation à la mixture magnésienne, les vitesses d'hydrolyse en milieu alcalin étant généralement petites. Le précipité ammoniacomagnésien a été transformé en phosphomolybdate d'ammonium pour sa détermination acidimétrique (dissolution dans un excès connu de soude caustique et titrage de l'excès d'alcali en présence de formol neutralisé bloquant l'ammoniaque). Lorsque la vitesse d'hydrolyse alcaline était appréciable, nous avons précipité d'emblée l'acide phosphorique libéré, comme phosphomolybdate d'ammonium en milieu nitrique. Comme les prises étaient portées au moins au décuple de leur volume pour cette opération, la concentration en ions Cl^{-} n'était pas gênante dans le cas des solutions chlorhydriques.

Pour le contrôle de l'allure de la réaction et pour la détermination du temps de demi-hydrolyse, constant pour une réaction de premier ordre, nous avons tracé la courbe du logarithme de la concentration de l'ester en fonction du temps, qui donne une droite pour une réaction de premier ordre. La pente de cette droite permet de calculer k et le temps de demi-réaction $t_{1/2} = 0,693/k$. Les temps de demi-hydrolyse sont exprimés sauf indication spéciale en heures. Sauf pour les hydrolyses en milieu alcalin, où à de rares exceptions près cette vitesse est très faible, nous avons suivi l'hydrolyse jusqu'à disparition de 90 à 95 % des fonctions ester.

Dans le cas des dérivés acylés des acides aminoalcoyl-phosphoriques, nous avons suivi en outre l'hydrolyse de la fonction acylamino par titrage au formol des fonctions amino mises en liberté.

II. Effets d'une fonction amino, libre ou acylée, sur l'hydrolysabilité des acides monoalcoyl-phosphoriques.

La préparation des acides aminoalcoyl-phosphoriques et de leurs dérivés respectivement acétylés, benzoylés et tosylés a été décrite antérieurement.

4) G. Brunisholz, Helv. **30**, 2028 (1947).

5) Du fait que Cherbuliez & Bouvier, Helv. **36**, 1200 (1953), n'ont pas tenu compte de cette circonstance, leurs données numériques concernant les vitesses d'hydrolyse des acides amino-2-éthyl-phosphorique et amino-3-propyl-phosphorique sont entachées d'erreurs systématiques (degrés d'hydrolyse trouvés trop forts).

Les acides propyl- à hexyl-phosphoriques non substitués que nous avons examinés à titre de comparaison, ont été préparés comme suit.

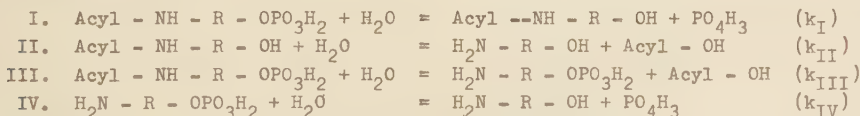
10 g de l'alcool correspondant sont chauffés 5 h dans un bain de 100° sous forte agitation (pour les alcools supérieurs) avec 50 g d'acide polyphosphorique (n. env. 2,7). Le produit refroidi est repris par de l'eau, neutralisé au carbonate de baryum et à la baryte au pH 8,5. Le filtrat et les eaux de lavage (600 à 700 ml) sont concentrés à chaud. Les monoalcylphosphates de baryum, moins solubles à chaud qu'à froid, sont filtrés à chaud et lavés à l'eau bouillante. Sans récupération du produit adsorbé sur le précipité de polyphosphates et de phosphate de baryum, on obtient des rendements qui, de l'acide propyl-phosphorique à l'acide hexyl-phosphorique, tombent de 35 à 15 %. Nous avons obtenu ainsi des sels anhydres que nous avons caractérisés par le dosage du phosphore, du baryum et la détermination du poids moléculaire par titrage différentiel entre la neutralisation du premier et celle du deuxième équivalent acide (voir tableau 2).

Tableau 2.
R-OPO₃Ba.

R	P %		Ba %		p. mol.	
	calc.	tr.	calc.	tr.	calc.	tr.
CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ - . . .	11,2	11,3	49,9	49,7	275,3	273,8
CH ₃ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ - . .	10,7	10,9	47,5	47,3	289,3	287,2
CH ₃ -(CH ₂) ₃ -CH ₂ - . .	10,2	10,0	45,3	45,0	303,3	300,5
CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CH ₂ - . .	9,77	9,70	43,3	42,9	317,3	314,0

Le tableau 3 contient les données numériques les plus importantes résultant de nos essais.

Observations concernant les résultats obtenus avec les acides acylamino-alcyl-phosphoriques. L'hydrolyse de ces substances comporte 4 réactions, soit simultanées, soit successives :



L'étude complète de ce système exigerait la détermination de 4 données indépendantes et poserait un problème mathématique assez compliqué. Comme seule une accélération marquée de la scission de la fonction ester phosphorique selon l'équation I par rapport à la scission selon IV (dont nous connaissons les constantes) nous intéressait ici, nous nous sommes contenté de déterminer, d'un côté la vitesse de l'apparition de PO₄H₃ (réactions I + IV) et, de l'autre, celle de la formation de fonctions NH₂ (réactions II + III). Lorsque $k_{\text{I}} \gg k_{\text{IV}}$, et que l'on calcule des constantes de réaction du premier ordre d'après les valeurs observées, on trouvera pour $t_{\frac{1}{2}}$ un chiffre inférieur à $t_{\frac{1}{2}}$ de la réaction IV, et ceci d'une manière d'autant plus marquée que la détermination du degré d'hydrolyse aura été faite après un laps de temps plus court; le chiffre ainsi obtenu constitue évidemment une limite supérieure en dessous de laquelle se trouvera la valeur vraie de $t_{\frac{1}{2}}$ pour la réaction I. L'inverse est le cas si $k_{\text{I}} < k_{\text{IV}}$. Ce n'est que lorsque l'hydrolyse de la fonction amide selon III est très rapide par rapport à celle de la scission de la fonction ester phosphorique selon I ($k_{\text{III}} \gg k_{\text{I}}$), que l'on ne peut plus tirer de conclusions quant au $t_{\frac{1}{2}}$ de la réaction I, ce qui est indiqué dans le tableau par "pas déterminable". C'est ce qui se produit notamment en milieu ClH n. et surtout NaOH n. pour la plupart des dérivés acétylés, parmi lesquels nous ne donnons des résultats que pour l'acide acétylaminoéthyl-phosphorique.

Tableau 3.

XHN—R—OPO₃H₂, temps de demi-hydrolyse, en h, en solution 0,1-m. à 100°.

Position du groupe XHN— dans R	XHN—R—	Milieu		
		ClH n.	pH = 4,5	NaOH n.
—	CH ₃ —CH ₂ — ^{a)}	46	31	∞ ^{b)}
2	H ₂ N—CH ₂ —CH ₂ —	30	7	~ 20000 ^{c)}
2	CH ₃ —CH ₂ —CH—CH ₂ — NH ₂	31	7	—
2	CH ₂ —CH ₂ — NH—COCH ₃	< 4	13	pas déterminable
2	CH ₂ —CH ₂ — NH—COC ₆ H ₅	1,5	13	pas déterminable
2	CH ₂ —CH ₂ — NH—tosyl	63	13	∞ ^{b)} ^{d)}
—	CH ₃ —CH ₂ —CH ₂ —	69	38	∞ ^{b)}
3	CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ — NH ₂	65	16	~ 20000 ^{c)}
—	CH ₃ —(CH ₂) ₂ —CH ₂ —	115	58	∞ ^{b)}
4	CH ₂ —(CH ₂) ₂ —CH ₂ — NH ₂	120	31	3300
4	CH ₂ —(CH ₂) ₂ —CH ₂ — NH—COC ₆ H ₅	< 120	—	pas déterminable
4	CH ₂ —(CH ₂) ₂ —CH ₂ — NH—tosyl	—	—	> 3300 ^{d)}
—	CH ₃ —(CH ₂) ₃ —CH ₂ —	70	40	∞ ^{b)}
5	CH ₂ —(CH ₂) ₃ —CH ₂ — NH ₂	76	25	~ 10000
5	CH ₂ —(CH ₂) ₃ —CH ₂ — NH—COC ₆ H ₅	77	32	pas déterminable
—	CH ₃ —(CH ₂) ₄ —CH ₂ —	90	46	∞ ^{b)}
6	CH ₂ —(CH ₂) ₄ —CH ₂ — NH ₂	82	46	~ 20000

^{a)} Déjà étudié, notamment par *J. Desjober*, C. r. hebdomadaire Séances Acad. Sci. **224**, 275 (1947). Nos chiffres pour ClH n. et pH 4,5 sont tirés des observations de *Desjober*.

^{b)} ∞ signifie qu'après env. 1000 h, il n'y a pas de quantités dosables de PO₄H₃ libéré, ce qui correspond à une hydrolyse de moins de 1%, soit à t_{1/2} > 50000 h.

^{c)} Les indications de *Cherbuliez & Bouvier*, Helv. **36**, 1200 (1953), concernant l'hydrolysabilité de ce corps sont erronées (voir^{e)}); nous avons pu confirmer au contraire la grande stabilité de l'acide aminoéthyl-phosphorique en milieu alcalin, observée déjà par *R. H. A. Plimmer & W. J. N. Burch*, Biochem. J. **31**, 398 (1937).

^{d)} En milieu alcalin, la fonction tosylamino est hydrolysée à env. 10% en une semaine.

En milieu chlorhydrique normal, les monoesters phosphoriques des alcools aliphatiques primaires à chaîne non ramifiée présentent une hydrolysabilité faible et qui passe par un minimum pour C₄ suivi d'un faible relèvement pour C₆; il est intéressant de noter à ce sujet que selon Plimmer & Burch 7), l'acide cétyl-phosphorique se comporte, en ce qui concerne son hydrolysabilité, à peu près comme les acides propyl- et butyl-phosphoriques. Au pH 4,5, on observe une variation analogue des temps de demi-hydrolyse, d'ailleurs nettement plus courts que pour le milieu chlorhydrique. En milieu NaOH n., on trouve partout une vitesse d'hydrolyse extrêmement petite, en confirmation de ce qui a été observé antérieurement.

L'introduction, dans la chaîne aliphatique, d'une fonction amino en position 2 provoque une nette augmentation de l'hydrolysabilité, que l'on peut chiffrer pour le milieu chlorhydrique et pour le pH 4,5; en milieu alcalin, la vitesse d'hydrolyse, de non mesurable dans nos conditions de travail, devient mesurable. En milieu chlorhydrique, cet effet accélérateur disparaît presque entièrement dès le passage de la position 2 à la position 3 ou à une position plus éloignée; au pH 4,5 l'effet diminue d'intensité avec l'augmentation de la distance entre fonction ester phosphorique et groupe amino, mais se fait sentir encore jusqu'à la position 5; en milieu NaOH n. on constate un maximum d'hydrolysabilité pour l'acide amino-4-butyl-phosphorique. Toutefois les vitesses d'hydrolyse en milieu alcalin restent toujours très faibles.

La substitution de la fonction amino placée en 2, par le reste acétique ou benzoïque se traduit par une augmentation de l'effet labilisant du groupe amino, pour le milieu acide, et par une diminution de ce même effet au pH 4,5; en milieu NaOH n., il n'y a en tous cas pas d'accélération marquée de l'hydrolyse de la fonction ester phosphorique, qui reste toujours très petite par comparaison à celle de la fonction amide carboxylique. Avec l'augmentation de l'écart entre fonction amino acylée et fonction ester phosphorique, ces effets disparaissent. Quant à la tosylation de la fonction amino, elle se traduit par une diminution de l'hydrolysabilité par rapport à celle du dérivé non tosylé.

En résumé, on constate que, si la présence d'une fonction amino en 2 par rapport à une fonction ester phosphorique se traduit par une certaine labilisation de la fonction ester phosphorique et si cette labilisation est accentuée en milieu acide ou au pH 4,5 par la transformation du groupe amino en amide carboxylique, ces effets sont peu marqués en milieu alcalin et ne sauraient expliquer l'alcalino-labilité des fonctions ester phosphorique de certaines phosphoprotéines et phosphopeptones.

III. Effet d'une fonction carboxyle (ou resp. carbalcoxy, carbamido et nitrile) sur l'hydrolysabilité des acides monoalcoyl (ou aryl)-phosphoriques.

Le tableau 4 résume nos observations faites avec quelques monoesters phosphoriques possédant, en α ou en β par rapport à

7) R.H.A. Plimmer & W.J.N. Burch, J. chem. Soc. 1929, 289.

l'hydroxyle phosphorylé, une des fonctions mentionnées dans le titre. En outre, nous avons examiné l'hydrolyse du dérivé phosphorylé d'un acide hydroxy-sulfonique, soit l'acide iséthionique phosphorylé.

Tableau 4.

Acides carboxy-, carbamido-, nitrilo- et sulfoxy-phosphoriques, temps de demi-hydrolyse, en h, en solution 0.1-m., à 100°

Substance	Milieu		
	C ¹ H n	pH 4.5	NaOH n.
H ₂ O ₃ POCH ₂ COOH	13	5	~ 800
H ₂ O ₃ POCH ₂ CN	13 ^{a)}	5	< 20
H ₂ O ₃ POCH ₂ CH ₂ COOH	23	18	4
H ₂ O ₃ POCH ₂ CH ₂ CONHC ₆ H ₅	—	—	0.5
H ₂ O ₃ POCH ₂ CH ₂ CN	25	18	~ 0.07 (~ 1 min)
H ₂ O ₃ PO\ /COOH	a)	—	1.25
H ₂ O ₃ PO\ /CONH ₂	b)	—	0.3
H ₂ O ₃ PO\ /CN	b)	—	< 0.07 (< 5 min)
H ₂ O ₃ POCH ₂ CH ₂ SO ₃ H	48	13	82

^{a)} En 1 h, 75% de la fonction C≡N sont hydrolysés.

^{b)} Hydrolyse assez rapide.

La préparation des corps en question est déjà décrite, à l'exception de celle de l'anilide de l'acide 3-hydroxypropionique phosphorylé. Pour obtenir cet acide carbanilido-2-éthyl-phosphorique à partir de l'acide carboxy-2-éthyl-phosphorique déjà décrit, nous avons tiré profit du fait que, contrairement aux fonctions carboxyle, les fonctions acides à atome central coordina-
tivement saturée (SO₄H₂, acides sulfoniques, PO₄H₃) ne réagissent que très lentement avec le chlorure de thionyle. En chauffant modérément un acide carboxyalcoyl-phosphorique avec SOCl₂, on réalise effectivement avant tout la transformation du carboxyle en chlorure d'acide, sans altération du groupe -PC₃H₂. Le produit brut de cette réaction, traité par de l'aniline, a fourni l'anilide en question. Le rendement très modeste en produit final (7%) pourrait certainement être amélioré.

Sel de Ba de l'acide carbanilido-2-éthyl-phosphorique. C₆H₅NHCOCH₂CH₂ CPO₃Ba. À 3,1 g (C, Cl mole) de carboxyéthyl-phosphate sesquibarytique on ajoute 15 ml SO₄H₂ 2-n. pour éliminer l'ion Ba⁺⁺. Après centrifugation, on chasse l'

eau sous pression réduite. Le résidu (qui ne contient que des traces de phosphore minéral) est chauffé 3 h à 50° avec 6 ml de SOCl_2 . On chasse ensuite dans le vide l'excès du chlorure de thionyle, dissout le résidu dans du benzène anhydre, ajoute 2 ml d'aniline sèche et chauffe 30 min à reflux. La solution est filtrée du chlorhydrate d'aniline précipité, le filtrat est débarrassé du reste d'aniline par lavages répétés à l'acide chlorhydrique dilué, puis on évapore sous vide la solution benzénique séchée. Le résidu, qui présente en quantités égales deux acidités titrables resp. à l'orangé de méthyle et à la phénolphthaléine, est repris dans peu d'eau et neutralisé à la phénolphthaléine par de l'eau de baryte. On filtre, concentre le filtrat sous vide et précipite le sel barytique cherché, par addition de 4 vol. d'alcool; rdt 0,3 g (6,8 %). Le sel contient 4 mol. d'eau de cristallisation.

$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5\text{NPBa}$, $4\text{H}_2\text{O}$	Calculé N 3,10 P 6,85 Ba 30,4 % p. éq. 452,3
Trouvé "	3,02 " 6,89 " 30,6 % " 449

Remarques concernant les déterminations des temps de demi-hydrolyse. A titre de comparaison avec les observations consignées au sujet des acides alcoylphosphoriques aminés, nous avons travaillé dans les mêmes conditions, et notamment à 100°, quoique pour certains dérivés étudiés ici, les vitesses d'hydrolyse fussent trop grandes pour pouvoir être mesurées avec précision. Ceci est notamment le cas pour les deux dérivés à fonction nitrile. En outre, lors de l'hydrolyse alcaline, les dérivés phosphorylés possédant en plus une fonction amide ou nitrile subissent relativement rapidement, à côté de la scission de la fonction ester phosphorique, une transformation resp. de CONH_2 en COOH et de CN successivement en CONH_2 et en COOH ; ces transformations aboutissent chaque fois à des dérivés phosphorylés chez lesquels l'hydrolyse du groupe ester phosphorique est plus lente que dans la molécule primitive (voir la discussion de ces cas à la p. 22). En calculant des "constantes de vitesse de réaction du premier ordre" d'après le taux de libération de PO_4H_3 à partir du temps 0, on trouve donc des valeurs décroissantes - et pour les temps de demi-scission $t_{1/2}$, des valeurs croissantes - avec l'accroissement du temps; $t_{1/2}$ trouvé au temps le plus court est le plus petit et constitue une limite supérieure de la valeur vraie du temps de demi-scission du groupe ester phosphorique.

Dans le cas du phospho-salicylonitrile, qui nous a semblé particulièrement intéressant, nous avons fait un nombre suffisant de mesures après des durées d'hydrolyse comprises entre 9 et 52 min, pour pouvoir procéder à une extrapolation graphique au temps zéro (voir fig. 2).

Quoique l'étude de l'effet des fonctions carboxyle, etc. ait été poussée jusqu'à présent beaucoup moins loin que celle de l'effet d'une fonction amino, les résultats acquis sont assez nets pour qu'on puisse en tirer les conclusions suivantes.

En milieu acide et au pH 4,5, les vitesses d'hydrolyse du groupe ester phosphorique des dérivés aliphatiques comportant encore une fonction carboxyle ou nitrile sont de l'ordre de celles qui ont été constatées pour les dérivés analogues, dans lesquels le groupe resp. COOH et CN est remplacé par NH_2 .

En milieu alcalin, il y a accroissement net de la vitesse de scission de l'ester phosphorique, pour les dérivés dans lesquels la fonction COOH ou CN est portée par l'atome de carbone hydroxylé (dérivés d'un acide α -hydroxy-carboxylique), par rapport à la très difficile hydrolyse alcaline des acides alcoylphosphoriques non substitués; mais les vitesses d'hydrolyse restent en dessous de ce qu'elles sont en milieu acide.

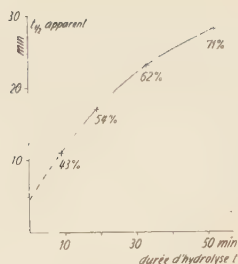


Fig. 2.

Détermination du temps de demi-hydrolyse $t_{1/2}$ de la fonction ester phosphorique du phosphosalicylo-nitrile, par extrapolation graphique (---).

(Chiffres en % : Degrés respectifs d'hydrolyse atteints aux temps t

Par contre, l'effet de la fonction COOH devient très marqué quand il s'agit de dérivés d'acides β -hydroxy-carboxyliques, type auquel appartient précisément la phosphosérine: le temps de demi-hydrolyse alcaline de 4 h trouvé pour le dérivé phosphorylé de l'acide β -hydroxypropionique est tout à fait de l'ordre de grandeur trouvé pour la phosphosérine dans des conditions analogues. Le remplacement de COOH par une fonction amide (seul exemple étudié: un anilide) se traduit par une augmentation considérable de la vitesse d'hydrolyse - tout comme les phosphoséryl-peptides sont plus hydrolysables que la phosphosérine 8). Le groupe nitrile finalement a un effet extraordinairement marqué puisque le temps de demi-scission déphosphorylante tombe à environ 4 min dans nos conditions de travail.

C'est intentionnellement que nous employons le terme de scission déphosphorylante dans le cas des dérivés à fonction nitrile en β par rapport au groupe ester phosphorique. En effet, on peut se demander s'il s'agit d'une véritable hydrolyse - suivie éventuellement d'une déshydratation du nitrile β -hydroxypropionique en acrylonitrile - ou si en réalité il y a élimination en $\alpha - \beta$ avec formation d'un dérivé acrylique; dans l'hydrolyse alcaline de peptides à restes de phosphosérine, il se forme effectivement de l'acide pyruvique et de l'ammoniaque.

Nous n'avons pas précisé ce point dans le cas du dérivé phosphorylé de l'acide β -hydroxypropionique, car nous avons préféré étudier le comportement d'un acide β -hydroxy-carboxylique phosphorylé, constitué de telle manière qu'une $\alpha - \beta$ élimination de PO_4H_3 fût impossible, et nous nous sommes adressé aux dérivés phosphorylés resp. de l'acide, de l'amide et du nitrile salicyliques. Nous n'avons pas étudié de plus près l'hydrolyse acide ou au pH 4,5, qui sont relativement rapides. Mais la scission alcaline déphosphorylante resp. du dérivé de l'acide, de l'amide et du nitrile est chaque fois encore plus rapide que celle des dérivés correspondants de l'acide β -hydroxypropionique, et il s'agit

8) Th. Posternak & H. Pollaczek, *Helv.* 24, 1190 (1941); la phosphosérine est hydrolysée de 7 % en 24 h en milieu NaOH 0,25-n. à 37°.

d'une hydrolyse puisque l'on obtient en fin de compte dans chaque cas intégralement de l'acide salicylique. L'activation considérable de l'hydrolyse alcaline de la fonction ester phosphorique, produite à des degrés croissants par un groupement COOH , CONH_2 et CN en position β , nous semble donc établie.

Quant au mécanisme de cette activation, nous voulons noter ici uniquement ceci que le caractère de non-saturation coordinative des fonctions COOH , CONH_2 et CN - particulièrement marqué pour CN qui est le plus activant - semble être un facteur essentiel dans cette activation, l'isostère soufré du dérivé phosphorylé de l'acide β -hydroxypropionique, l'acide phospho-iséthionique $\text{H}_2\text{O}_3\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, étant hydrolysé en milieu alcalin 20 fois plus lentement que le dérivé phosphorylé de l'acide hydroxypropionique.
